

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-237139

(43)Date of publication of application : 17.09.1993

(51)Int.Cl.

A61F 2/02

(21)Application number : 04-076194

(71)Applicant : NIPPON HAM KK

(22)Date of filing : 27.02.1992

(72)Inventor : HIRAI KEIICHI
SHIMADA HIROKI
TAJI SHIROU

(54) NEURANAGENESIS ASSISTING MATERIAL AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the neuranagenesis assisting material (artificial nerve) used for treating the damage of the peripheral nerve, etc., and the process for producing the material.

CONSTITUTION: This neuranagenesis assisting material consists of a bundle of collagen fibers (CLF) coated with laminine (LN) and fibronectine (FN) and is produced by bringing the CLF fiber into contact with a soln. contg. the LN and the FN. The CLF having excellent bioaffinity and bioabsorptivity is used as a base material. The CLF is coated with the LN and FN which accelerate the neuranagenesis, and therefore the rapid and sure neuranagenesis is assured. Particularly the FN has the effect of preventing the cicatrization to hinder the growth of neuraxon by preventing the limitless infiltration of the fibroblasts, and therefore the neuranagenesis is possible even in the case of long intervals.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 26.02.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3457339

[Date of registration] 01.08.2003

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-237139

(43)公開日 平成5年(1993)9月17日

(51)Int.Cl.⁵

A 6 1 F 2/02

識別記号

庁内整理番号

7180-4C

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数6(全 4 頁)

(21)出願番号 特願平4-76194

(22)出願日 平成4年(1992)2月27日

(71)出願人 000229519

日本ハム株式会社

大阪府大阪市中央区南本町3丁目6番14号

(72)発明者 平井 圭一

石川県金沢市橋場町9-23

(72)発明者 島田 ひろき

茨城県つくば市緑ヶ原3-3 日本ハム株式会社中央研究所内

(72)発明者 太治 司郎

茨城県つくば市緑ヶ原3-3 日本ハム株式会社中央研究所内

(74)代理人 弁理士 廣瀬 孝美

(54)【発明の名称】 神経再生補助材及びその製造法

(57)【要約】

【目的】 末梢神経損傷などの治療に用いられる神経再生補助材(人工神経)及びその製造法を提供することを目的とする。

【構成】 本発明の神経再生補助材は、ラミニン(LN)及びフィブロネクチン(FN)をコーティングしたコラーゲンファイバー(CLF)の束からなり、本発明の製造法はCLF束をLN及びFNを含有する溶液と接触させることからなる。本発明においては、生体適合性及び生体吸収性に優れるCLFが基材として用いられており、また当該CLFは神経再生を促進するLN及びFNでコーティングされているので、迅速且つ確実に神経再生を図ることができる。特にFNが線維芽細胞の無制限の侵入を妨げ、神経突起伸長の妨害となる瘢痕化を防ぐ作用を有するので、間隔が長い場合においても神経再生が可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラミニン及びフィブロネクチンをコーティングしたコラーゲンファイバーの束からなる神経再生補助材。

【請求項2】 ブレード状外筒管内に挿入されている請求項1記載の神経再生補助材。

【請求項3】 ブレード状外筒管がポリエステル又はコラーゲンからなる請求項2記載の神経再生補助材。

【請求項4】 コラーゲンファイバー束を、ラミニン及びフィブロネクチンを含有する溶液と接触させることからなる神経再生補助材の製造法。

【請求項5】 コラーゲンファイバー束を、ラミニン及びフィブロネクチンを含有する溶液に浸漬することからなる請求項4記載の神経再生補助材の製造法。

【請求項6】 ブレード状外筒管内にコラーゲンファイバー束を挿入した後、ラミニン及びフィブロネクチンを含有する溶液に浸漬する請求項5記載の神経再生補助材の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は神経再生補助材及びその製造法に関する。より詳細には、コラーゲンファイバーを基材とし、神経再生を効果的に行うことができる神経再生補助材に関する。

【0002】

【従来の技術】交通事故や労働災害等による末梢神経損傷の治療は外科領域—特に整形外科—で大きな位置を占めている。近年、切断した神経をつなぐ外科手術の技術は顕微手術の導入によって著しい進歩を遂げてきた。しかし、神経の欠損部を何かで補わなければならない程大きい場合、この治療は外科医にとって難問となる。臨床的に現在行われているのは腓腹神経を用いる自家神経移植である。自家神経は最も理想的な補助材料ではあるが、患者の負担や、手術の複雑化等によって、その採取には制限がある。更には、実生活において、それ程支障にはならないとは言え、腓腹神経の切除によって足首から足の甲にかけての小指側の皮膚感覚が消失するので、できれば自家神経移植を避けることが望ましい。よって自家神経に替わる移植材料の開発が切望され、種々の方法が考案、研究されている。例えば、神経以外の組織を用いた自家移植として自家血管移植や自家筋膜移植等があるが手術の複雑化は自家神経移植と変わらない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】上述の点から、再生する神経の誘導路として人工材料からなる神経再生補助材（人工神経、神経グラフトなどとも称される）を移植する方法が研究されている。例えば、神経の再生に関し、*in vitro*でラミニン（以下、LNという）又はフィブロネクチン（以下、FNという）が神経突起伸長因子であるという報告がされており、かかる知見に基づき、切断

した神経と神経を繋ぐシリコンチューブ内にLNを注入することによって、神経再生が促進されたという報告もなされている。また、LN、FN両者をシリコンチューブ内に注入することによって、これまででない長さの間隔における神経再生が可能になったとの報告もある。しかしながら、このようなシリコンチューブを用いる方法においては、神経修復後も材料が生体内に残り、生体適合性及び生体吸収性の面から問題がある。また、この方法においては、チューブと神経線維束間に隙間ができ、元の太さまで戻らないことが報告されている。本発明は上記従来技術の欠点を解消すべくなされたもので、本発明者らは神経再生補助材について鋭意検討した結果、LN及びFNで処理したコラーゲンファイバー束を基材として用いることにより、神経再生性に優れると共に生体適合性及び生体吸収性の良好な神経再生補助材が得られることを見出して本発明を完成した。即ち、本発明はコラーゲンファイバーを基材とし、神経再生性などに優れた神経再生補助材及びその製造法を提供することを目的とする。

20 【0004】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するためになされた本発明の神経再生補助材は、LN及びFNをコーティングしたコラーゲンファイバーの束からなり、特にブレード状外筒管に挿入された形態が好適である。また、本発明の神経再生補助材の製造法は、コラーゲンファイバー束を、LN及びFNを含有する溶液と接触させることからなり、特にコラーゲンファイバーをブレード状外筒管に挿入した後、上記溶液に浸漬する方法が好適である。本発明者らは神経再生補助材について種々研究した結果、神経再生補助材の基材としてコラーゲンファイバーが極めて優れた特性を有するという知見を得て、コラーゲンファイバー束を生体内に移植して神経再生を検討したが、神経再生に際し、コラーゲンファイバー間に線維芽細胞が侵入して神経突起伸長の妨害となる瘢痕化を生じ、神経再生が阻害されるという問題があった。かかる問題を解消する方法を検討した結果、コラーゲンファイバーをFNでコーティングすることにより、コラーゲンファイバー間への線維芽細胞の無制限の侵入が抑制され、その結果、神経再生が速やかに進行することを見出した。本発明はかかる知見に基づいてなされたものである。

40

【0005】本発明において使用されるコラーゲンファイバーは、常法に準じ、コラーゲン溶液から紡糸することにより得ることができる。ここで用いられるコラーゲンはファイバー化可能なものであれば、その由来、性状などは特に限定されないが、抗原性を示さないことから酵素可溶化コラーゲン又はアルカリ可溶化コラーゲンが好適に用いられる。コラーゲンファイバーの調製は慣用の紡糸法にて行うことができ、その一例の概略を説明すると、原料コラーゲン（所謂、不溶性コラーゲン）を、

50

無機酸又は有機酸の酸性条件下(例えば、 $\text{pH} 2 \sim 3$ 程度)で溶解した後、蛋白質分解酵素(例えば、ペプシン、プロナーゼなど)で処理し、上清を分離する。この上清の pH 調整(例えば、 $\text{pH} 9 \sim 9.5$ 程度)を行って等電点沈殿させ、遠心分離により沈殿物を分離する。得られた沈殿物を酸(又は中性塩)を用いて再溶解し、濃度調整(5~10%程度)を行って、紡糸原液とする。かくして得られた紡糸原液を脱気した後、ノズル($\phi 100 \sim 250 \mu\text{m}$ 程度)から凝固浴(例えば、アルコール、アセトン、塩類など)中に押出して繊維状とし、ロール速度で延伸率を調整しながらロールに巻き取る。なお、巻き取ったファイバーは、脱塩し、乾燥した後、コラーゲンファイバーとして使用した。かくして調製されたコラーゲンファイバーの径としては、直径が50~200 μm 程度、好ましくは50~100 μm 程度のものが使用される。なお、コラーゲンファイバーは、中空糸状のものであってもよい。

【0006】本発明においては、上記のコラーゲンファイバーはLN及びFNでコーティングされたものが用いられる。かかるコーティングは適宜な方法にて行うことができ、例えば、コラーゲンファイバー束をLN及びFNを含有する溶液と接触させることにより行うことができる。より好ましくは、適宜な本数のコラーゲンファイバーを緩く束ねたもの又は適宜な本数のコラーゲンファイバーをブレード状の外筒管内に挿入したものを、LN及びFNを含有する溶液に浸漬することにより行われる。なお、LN溶液に浸漬した後にFN溶液に浸漬したり、またその逆の順で浸漬してもよい。溶液中のLN及びFNの濃度は適宜調整することができるが、それぞれ10~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度、好ましくは30~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度とされる。溶媒としては、精製水又は適当な緩衝液(例えば、生理的リン酸緩衝液など)が用いられる。浸漬時間、浸漬温度などは適宜選択できるが、通常、37℃、1時間程度にて行われる。また、上記の操作は無菌的に行うのが好ましく、使用する材料は事前に滅菌したものを使用するのが好ましい。上記のブレード状外筒管としては、ポリエステル、コラーゲンなどの生体適合性材料からなるブレード状管状体が挙げられ、特に生体適合性及び生体吸収性に優れるコラーゲンからなるものが好ましい。ブレード状外筒管は埋植操作の簡便化などを図る上で有用であり、かかる外筒管の管径、網目形状及びその径などは使用箇所、挿入するコラーゲンファイバーの本数などにより適宜調整することができる。なお、LN及びFNによるコラーゲンファイバーのコーティングは、上記の例に限定されるものではなく、例えば、LN及びFNを含有する溶液をコラーゲンファイバーに塗布したり噴霧してもよく、更に前述したコラーゲンファイバーの調製の際に、コラーゲン紡糸原液にLN及びFNを溶解することにより、生成したコラーゲンファイバー中にLN及びFNを含有させ、埋植後、こ

れらの成分が徐々に拡散・滲出する形態であってもよい。

【0007】本発明の神経再生補助材は、末梢神経損傷などにより神経が切断された個所に埋植することにより神経再生に使用され、切断間隔が長い場合においても神経再生を可能にすることができる。

【0008】

【実施例】以下、本発明を実施例及び実験例に基づいてより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例1

神経再生補助材の調製(材料と方法)

① コラーゲンファイバー(直径約70 μm)100本の一端を束ね、針に繋げた。この針を、ブレード状のポリエステル外筒管(直径2 mm)に通してコラーゲンファイバーを充填した後、長さ1 cmに切断した。かくして、コラーゲンファイバーを神経誘導路とする神経グラフトを調製した。ポリエステルは人工血管の素材であるポリエチレンテレフタレートを用いた。なお、手術の際、神経束の端をチューブ内に入れて縫合するため、コラーゲンファイバーが外筒のポリエステルチューブの両端から1 mmずつ短くなるように切断した。

② 生理的リン酸緩衝液(PBS)にLN(Rat yolk sac tumor, CHEMICON)及びFN(Rat plasma, CHEMICON)を各々50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように溶解した液を準備し、それに①で作製したグラフトを浸漬し(37℃、1時間)、コーティングした。この際、コラーゲンファイバーは、PBS浸漬によって膨潤するが、膨潤後もチューブ内に隙間ができるような量を充填した。なお、上記①及び②において、材料はすべて滅菌したものをを用い、操作は無菌的に行った。

【0009】比較例1

実施例1の①と同様にして調製した神経グラフトを、LNを50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有するPBS緩衝液に浸漬し(37℃、1時間)、コーティングした。

【0010】実験例1

①神経グラフトの埋植

ラットの坐骨神経を1 cm切断、除去し、そこに実施例1及び比較例1で調製した神経グラフトをそれぞれ埋植した。術後10日、30日、60日に神経を取りだし光学顕微鏡及び電子顕微鏡により観察した。また、一部は摘出の前に、グラフト縫合部両端より5 mmずつ離れた位置に電極を付け、神経活動電位を測定した(Lester Packer著 Experiments in Cell Physiology, Academic Press, p.251-268参照)。

②実験結果

(1)本発明の神経再生補助材(LN及びFNコーティング神経グラフト)術後30日で多くの神経突起がグラフト末端まで伸びており、その形態は正常な神経組織と同様であった。60日後では、グラフト中央部で神経線維

束がチューブ内部一杯に埋め尽くしているのが観察された。神経活動電位に関し、術後30日ではグラフトの前後で下行性の弱い活動電位が導出され運動神経の成長が示唆された。術後60日の運動神経及び知覚神経の活動電位を図1に示す。図1中、AはLN及びFNコーティング神経グラフトの場合を示し、A-1は運動神経活動電位を、A-2は知覚神経活動電位を示す。また、Bはコラーゲンファイバーのみの神経グラフトの場合を示し、B-1は運動神経活動電位を、B-2は知覚神経活動電位を示す。図に示されるように、LN及びFNコーティング神経グラフトの場合、明瞭な下行性及び上行性の活動電位が導出され、運動・知覚両神経の成長が確認された。なお、発明者らは、FNが神経再生にどのような影響を与えているかを抗FN抗体処理したラットの自家神経移植の実験で調べた。その結果、神経再生の際、神経組織内に於いては線維芽細胞は、神経の誘導路となる基底膜の筒の外側にあるFNをマスクすると基底膜を認識してそれを覆うようになるが、FN存在下では認識しないことが明らかとなった。この結果は、神経の誘導路となるコラーゲンファイバー間への線維芽細胞の侵入をFNが抑制することを示唆している。

(2)比較例1の神経再生補助材(LNコーティングの神経グラフト)術後30日でグラフトは線維芽細胞がコラーゲンファイバー間に侵入し瘢痕化していた。そのため、神経突起は伸長を妨げられる形となってグラフト末端まで伸びてはいたが、その数は少なかった。なお、何*

*もコーティングしていない神経グラフトを埋植した場合には、伸びている神経線維の数は明らかに減少した。

【0011】

【発明の効果】以上のように、本発明の神経再生補助材においては、生体適合性及び生体吸収性に優れるコラーゲンファイバーが基材として用いられており、また当該コラーゲンファイバーは神経再生を促進するLN及びFNでコーティングされているので、迅速且つ確実に神経再生を図ることができる。特にFNが線維芽細胞の無制限の侵入を妨げ、神経突起伸長の妨害となる瘢痕化を防ぐ作用を有するので、間隔が長い場合においても神経再生が可能となる。このように本発明の神経再生補助材は、神経再生のみならず生体適合性及び生体吸収性の面でも優れた特性を有し、しかも容易に製造することができるという効果を奏する。また、本発明の製造法によれば、上記の特性を有する神経再生補助材を簡便に調製することができ、機械化による製法へのステップワイズが容易であるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】実験例1において、神経グラフト埋植60日後の運動神経及び知覚神経の活動電位を示す図である。図中、AはLN及びFNコーティング神経グラフトの場合を示し、A-1は運動神経活動電位を、A-2は知覚神経活動電位を示す。また、Bはコラーゲンファイバーのみの神経グラフトの場合を示し、B-1は運動神経活動電位を、B-2は知覚神経活動電位を示す。

【図1】

